

一酸化窒素による滑膜培養細胞からのTNF- α 産生 - 関節リウマチと変形性関節症の比較-

著者	小倉 健
号	1936
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/22428

氏 名（本籍）	小 ^お 倉 ^{ぐら} 健 ^{けん}
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 9 3 6 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	一酸化窒素による滑膜培養細胞からの TNF- α 産生 －関節リウマチと変形性関節症の比較－
論文審査委員	<p>（主 査）</p> <p>教授 国 分 正 一 教授 佐々木 毅</p> <p>教授 山 田 敦</p>

論文内容要旨

目 的

関節リウマチ (RA) 患者の血清中、関節液中では変形性関節症 (OA) 患者に比較して、一酸化窒素 (NO) 代謝産物が高濃度にみられる。そして血清中より関節局所で産生が亢進していること、関節炎モデル動物に NO 合成阻害薬を投与することで滑膜炎が消退することから、NO が滑膜炎の悪化に重要な役割を果たしていることが考えられている。また、TNF- α は RA 患者で高濃度に産生されており、RA の病態に影響を与えていることが報告されている。NO と TNF- α の関係については、TNF- α 、IL-1、Lipopolysaccharide (LPS) により滑膜培養細胞の NO 合成酵素 (iNOS) の産生と培養液中の NO 酸化物である nitrite の産生が亢進したと報告されている。そして、RA 患者関節液中の単核球培養細胞と、滑膜初代培養細胞で NO 供与薬の S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) 添加により TNF- α 産生がみられ、SNAP の濃度依存的に培養上清中の TNF- α 濃度が増加したことが報告され、NO と TNF- α の positive feedback が存在する可能性が示唆されている。しかし、RA 患者の 2 例のみから採取した滑膜培養細胞での検討であること、mRNA レベルでの検討や、OA や正常の滑膜細胞と RA の滑膜細胞での比較が行われていない。本研究の目的は、OA と RA 滑膜培養細胞において NO 刺激による TNF- α 産生量の違いを検討し、RA 病態における NO の役割を知ることである。

方 法

(1) OA, RA 患者から採取した滑膜細胞を、第 2 ～ 3 継代まで培養して使用した。(2) 免疫染色により培養細胞中の CD68 陽性滑膜マクロファージ様細胞の比率を計測した。(3) 培養細胞に 1 ng/ml TNF- α のみ、または 1 ng/ml TNF- α 、1 ng/ml IL-1、10 μ g/ml LPS を混合した培養液を添加し、48 時間後に培養上清中の nitrite/nitrate 濃度を測定した。(4) コンフルエントの培養細胞に NO 供与薬 SNAP (100, 500, 1000 μ M) を添加し、3, 6, 12, 24 時間後に培養上清中の TNF- α を ELISA 法で測定した。(5) SNAP (1000 μ M) 添加 6 時間後に total RNA を抽出し quantitative real time PCR で TNF- α の mRNA 発現量を計測した。(6) 96 well plate で RA 滑膜細胞を培養し、TNF- α (100, 500, 1000 pg/ml) を添加して、72 時間後に WST-1 を使用し細胞増殖を計測した。

結 果

(1) CD68 陽性細胞は OA 群, RA 群でともに 3 %前後存在していた。2 群間に有意差はみられなかった。(2) 滑膜培養細胞を TNF- α のみで刺激したところ、培養上清中の nitrite/nitrate 濃

度は OA 群では $11.92 \pm 2.07 \mu\text{M}$, RA 群では $12.11 \pm 2.57 \mu\text{M}$ で, OA 群, RA 群ともに control 群と TNF- α 刺激群の間に NO 産生量の有意な増加はみられなかった。一方, TNF- α , IL-1, LPS による刺激により, 培養上清中の nitrite/nitrate 濃度は OA 群では $15.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$, RA 群では $14.4 \pm 0.54 \mu\text{M}$ で, OA 群, RA 群ともに control に比較して有意に NO の産生の上昇がみられた。OA 群, RA 群間に NO 産生量の有意差はみられなかった。(3) SNAP 添加後の培養上清中の TNF- α は, OA 群で SNAP $500 \mu\text{M}$ を添加し 6 時間後に計測した群で $159.97 \pm 136.00 \text{ pg/ml}$, RA 群では $605.70 \pm 528.08 \text{ pg/ml}$ と最大値を示し時間経過とともに低下した。SNAP $500 \mu\text{M}$ での TNF- α 産生量は, RA 群が OA 群に比較して約 4 倍亢進し有意差がみられた ($P < 0.01$)。 (4) TNF- α mRNA 発現量は OA 群では SNAP 添加前に比べて, OA 群で 2.4 ± 1.8 倍, RA 群で 35.6 ± 32.6 倍であった。RA 群が OA 群に比較して約 15 倍亢進し有意差がみられた ($P < 0.01$)。 (5) TNF- α 刺激による滑膜細胞の増殖は, control 群と比較して TNF- α 500 pg/ml の群で 116% ($P < 0.01$), 1000 pg/ml の群で 120% ($P < 0.001$) と濃度依存的に増殖していた。

考察および結論

滑膜培養細胞で TNF- α , IL-1, LPS により NO が産生され, 次いで NO 刺激により TNF- α が産生されることが確認された。以上より NO により産生された TNF- α が iNOS の産生を介し, 再び NO を産生するという NO-TNF- α cyclic system が存在する可能性が示唆された。OA と RA の病態の違いを考えたとき, RA 滑膜では NO による TNF- α 産生が OA より亢進した事実より, この過程で OA と RA は異なっている可能性がある。そして, TNF- α 刺激により RA 滑膜培養細胞が増殖したことも考え合わせると, 関節リウマチの関節局所において, この NO-TNF- α cyclic system が存在すれば, TNF- α による滑膜細胞の増殖のために関節滑膜組織の肥厚が進むことが考えられる。

審査結果の要旨

関節リウマチ (RA) では、TNF- α により培養滑膜細胞の iNOS 産生と培養液中の一酸化窒素 (NO) 酸化物である nitrite の産生が増し、S-nitroso-N-acethyl-D,L-penicillamine (SNAP) の濃度に依存して TNF- α 濃度が増したとの報告があり、NO と TNF- α の positive feedback 作用の可能性が示唆されている。しかし、mRNA レベルでの検討や、変形性関節症 (OA) や正常の滑膜細胞と RA の滑膜細胞での比較が行われていない。そこで本研究では、NO・TNF- α positive feedback system の存在を検証することを目的とした。

① OA, RA 患者から採取した滑膜細胞を第 2～3 継代まで培養した。② 免疫染色により培養細胞中の CD68 陽性マクロファージ様細胞の比率を求めた。③ 培養細胞に 1 ng/ml TNF- α , または 1 ng/ml IL-1, 1 ng/ml TNF- α , 10 μ g/ml LPS を混合した培養液を添加し、48 時間後に上清中の nitrite/nitrate 濃度を測定した。④ コンフルエントの培養細胞に SNAP (100, 500, 1000 μ M) を添加し、3, 6, 12, 24 時間後に上清中の TNF- α を ELISA 法で測定した。⑤ SNAP (1000 μ M) 添加 6 時間後に RNA を抽出し quantitative real time PCR で TNF- α の mRNA 発現量を計測した。⑥ 培養 RA 滑膜細胞に TNF- α (100, 500, 1000 pg/ml) を添加し、72 時間後に WST-1 を使用して細胞増殖を計測した。

その結果、① CD68 陽性細胞は OA 群, RA 群ともに 3% 前後存在したが、2 群間に有意差はみられなかった。② TNF- α のみの刺激では、OA, RA 群ともに NO 産生量の有意な増加はみられなかった。IL-1, TNF- α , LPS による刺激では、OA, RA 群ともに control に比較して NO 産生量の有意の増加がみられたが、OA, RA 群間に有意差はみられなかった。③ SNAP 500 μ M 添加での TNF- α 産生量は、RA 群が OA 群に比較して約 4 倍の亢進がみられた ($P < 0.01$)。④ TNF- α mRNA 発現量は SNAP 添加前と比べ、RA 群が OA 群に比較して約 15 倍の亢進がみられた ($P < 0.01$)。⑤ TNF- α 刺激により滑膜細胞は、control 群と比較して TNF- α 500 pg/ml の群で 116% ($P < 0.01$), 1000 pg/ml の群で 120% ($P < 0.001$) と濃度依存的に増殖していた。即ち、TNF- α により NO が産生され、次いで NO 刺激により TNF- α が産生されることが確認された。

以上、本研究は、RA 滑膜では NO・TNF- α positive feedback system が存在し、TNF- α によって関節滑膜の肥厚が進むことを強く示唆したもので、RA の病態解明において学問的価値が極めて高く、学位授与に十分値する。